

A teljes kutatási periódusra tervezett vizsgálatok megvalósultak, valamint néhány az eredeti tervben nem szereplő, de témaválasztását tekintve az eredeti munkatervhez kapcsolható vizsgálat is lezárult. A tudományos eredmények közlése részben megtörtént, részben jelenleg zajlik.

Eredmények: A myofibrilláris fehérjék szulfhidril-csoportjain (SH) bekövetkező oxidáció myocardiális kontraktilitásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk SH-specifikus oxidáló és redukáló szerek segítségével permeabilizált, izolált humán szívizomsejteken. Az oxidálószerként használt 2,2'-ditiodipiridin (DTDP) dózis függő módon megszüntette az izometriásan mért maximális Ca^{2+} -aktivált erőt (F_o) ($\text{EC}_{50}=2,82\pm0,2$ mM; $\text{átlag}\pm\text{SEM}$; $n=6$). 2,5 mM DTDP kezelés ($n=28$) csökkentette a F_o -t ($\Delta F_o=34\pm2\%$), a Ca^{2+} -érzékenységet ($\Delta \text{pCa}_{50}=0,2\pm0,02$), és az aktin-miozin ciklus kinetikáját jellemző ktr paramétert ($\Delta \text{ktr}=0,262\pm0,03$ sec⁻¹). Ezek a DTDP hatásra kialakuló mechanikai változások teljes mértékben visszafordíthatóak voltak a két tiol csoporttal rendelkező ditiotreitollal (10 mM DTT; $n=14$), viszont csak részleges reverziót sikerült elérni a molekulánként egy tiol csoportot tartalmazó redukált glutation (GSH; 10 mM; $n=9$) vagy N-acetil-L-cisztein (NAC; 10 mM; $n=8$) alkalmazásával. Ellman-reagenssel végzett vizsgálatok szerint a fehérjék SH csoportjai 10 mM DTDP hatására csaknem teljesen eloxidálódtak. Továbbá, 3 mM DTDP hatására a szabad SH csoport számában bekövetkező csökkenés (100%-ról $15,1\pm1,8\%$ -ra) DTT-vel teljesen ($96,7\pm14,1\%$ -ig), GSH-nal, NAC-nel csak részlegesen ($34\pm7,6\%$ -ig, és $30,3\pm3,9\%$ -ig) volt visszafordítható. A különböző myofibrilláris fehérjék SH-oxidációra mutatott érzékenységét (+)-biotinil-jodoacetamidil-3,6-dioxaoktanediámin alkalmazásával határoztuk meg. Utóbbi vizsgálatok szerint az SH-csoportok modifikációja számos kontraktilis fehérjében, de eltérő DTDP koncentráció tartományban következik be. A DTDP EC_{50} -nek megfelelő koncentrációknál elsősorban az aktin és 1-es típusú miozin könnyű lánc fehérje SH-csoportjainak az oxidációja jött létre. Ezen fehérjék oxidációja ezért kritikus szerepet játszhat a myocardium oxidatív anyagcserezavarainak során kialakuló kontraktilis funkció csökkenésben.

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a genetikai mutáció révén előidézett szívelégtelenség egyik egérmodelljében (Tgalfaq*44), illetve az elektromos ingerléssel előidézett szívelégtelenség sertésmodelljében felismerhetőek-e az in vitro létrehozott fehérje-oxidáció okozta mechanikai változások. A szívizomsejtek mechanikai sajátosságai (pl. a kontrollhoz viszonyított fokozott Ca^{2+} -érzékenység) ezt a lehetőséget azonban mindkét modell esetében valószínűtlenné tette. Továbbá az Ellman-reagenssel végrehajtott meghatározások eredményei sem támasztották alá a szívelégtelenné váló transzgén egérszívekből izolált szívizomsejtek jelentős mértékű oxidatív károsodását. Mindezek alapján a szívelégtelenség Tgalfaq*44 egérmodelljében és elektromos ingerléssel létrehozott sertésmodelljében létrejövő kontraktilis funkciózavarban a kontraktilis fehérjék SH-oxidációjának alárendelt szerepe lehet.

A peroxinitrit-függő SH csoport oxidáció és kontraktilis funkció összefüggéseit humán szívizomsejteken vizsgáltuk. A peroxinitrit SH csoport oxidáció-függő mechanikai hatásainak feltárása érdekében humán donor eredetű szívizomsejteket peroxinitrittel kezeltük, majd különböző redukáló szerek (ditiotreitoll (DTT), N-acetil-L-cisztein (NAC) vagy redukált glutation (GSH) jelenlétében végeztünk inkubációkat. A peroxinitrit majd SH-redukáló ágensek alkalmazását követő mechanikai funkció visszatérés mértéke a peroxinitrit okozta mechanikai funkcióvesztés SH csoport-függő komponensének nagyságát illusztrálta. Ezt a stratégiát követve azt kaptuk, hogy a maximális Ca^{2+} -telítés mellett mért izometriás erő 50 mikroM peroxinitrit kezelés után $56\pm4\%$ -ra csökkent, melyet 10 mM DTT 13%-kal fokozott. (A kezeletlen kontroll: 100%.) 10 mM NAC mechanikai hatása 50 mikroM peroxinitrit kezelés után a DTT-éhez hasonló volt. A fehérjék SH csoportjai akár 1 mM peroxinitritet

(redukált SH csoportok aránya: $58 \pm 7\%$) követő 10 mM DTT kezelés után is teljes mértékben redukált állapotba kerültek (redukált SH csoportok aránya: $94 \pm 5\%$). Tehát az izometriás erő részleges reverziója a redukáló ágensek után az SH-csoportok oxidációjától függő mechanikai komponenst (a teljes funkcióvesztést 100%-nak véve) közel 20%-os részesedéssel azonosította. Az aktin-miozin keresztkötési kinetikára 50 mikrométer peroxinitrit nem fejtett ki hatást, utalván arra, hogy a Ca^{2+} -aktiváció regulációja 50 mikrométer peroxinitrit alkalmazása után nem változott. Erőfeszítéseket tettünk annak érdekében is, hogy azonosítsuk a szarkomert alkotó fehérjék azon csoportját, melyek a peroxinitrit kezeléseket követő redukáló szer expozíciók során szelektív oxidációs-redukációs ciklusokon mentek keresztül. A fehérje-biotinilációs eljárást tartalmazó módszerünk által nyújtott homogén intenzitás módosulások alapján azonban nem sikerült kiválasztanunk olyan fehérjéket, melyek kiemelkedő jelentőséggel bírnának a szívizomsejtek peroxinitrit okozta SH-oxidatív károsodásában, és a következményes mechanikai funkció változásokban.

Az akut myocardiális infarktus után bekövetkező oxidatív sejtkárosító folyamatok molekuláris szintű tanulmányozása érdekében laboratóriumi egerek bal elülső leszálló coronaria lekötése következtében kialakuló elülső fali myocardiális infarktusból származó szívizomsejtekkel végeztünk kísérleteket. Kísérleteink során egészséges (kontroll) és infarktust elszenvedett (MCI) egerek bal kamrájának infarktusos (Ant) és ellenoldali területéről (Inf) nyert szívizommintákat vontunk be. Permeabilizált szívizomsejteken 1,9 μm -es és 2,3 μm -es szarkomerhosszon váltottunk ki izometriás kalcium-kontraktúrákat, és mértük a kalcium-aktiválta aktív erőt, a kalciumtól független passzív erőt, a sejtek kalcium-érzékenységét (pCa_{50}), illetve az aktin-miozin ciklus sebességének maximumát (ktr,max). A Frank-Starling mechanizmus minden csoportban megtartott volt. Az infarktusos sejtek kalcium-érzékenysége az egészséges sejtekéhez viszonyítva mindkét szarkomerhosszon szignifikánsan kisebbnek bizonyult (pCa_{50} átlag \pm SEM; 1,9 μm : kontroll: $5,85 \pm 0,02$; MCI: $5,71 \pm 0,05$; 2,3 μm : kontroll: $5,95 \pm 0,02$; MCI: $5,79 \pm 0,05$). A keresztmetszetre normalizált aktív erőértékek nem tértek el egymástól, míg a passzív erő 1,9 μm -es szarkomerhosszon az infarktusos területen nagyobbak adódott (kontroll Ant: $0,2 \pm 0,03 \text{ kN/m}^2$; MCI Ant: $0,38 \pm 0,08 \text{ kN/m}^2$). A ktr,max érték jelentősen kisebb volt az MCI egerekben az infarktus oldalán az ellenoldalhoz képest (1,9 μm : Ant: $2,82 \pm 0,17 \text{ 1/sec}$; Inf: $3,89 \pm 0,26 \text{ 1/sec}$; 2,3 μm : Ant: $2,66 \pm 0,15 \text{ 1/sec}$; Inf: $4,23 \pm 0,15 \text{ 1/sec}$). Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy szívinfarktus hatására csökken a kontraktilis rendszer kalcium-érzékenysége és az aktin-miozin ciklus sebessége, megnő a passzív erő, de a Frank-Starling mechanizmus háttéré nem változott. Western immunoblot segítségével határoztuk meg a troponin I (TnI) protein kináz A (PKA) és protein kináz C (PKC) függő foszforilációs szintjét. Az aktin redukált SH csoportjainak mennyisége, és annak in vitro dithiothreitol (DTT) kezeléssel indukált fokozása az SH-oxidáció mértékét jellemezte. Az aktin, α -aktinin és a miozin nehéz lánc (MHC) karboniláltsági fokát OxyBlot módszerrel határoztuk meg. Az infarktusos területéről származó TnI PKA-függő foszforilációs szintje jelentősen alacsonyabb volt a kontrollhoz képest (MI Ant: $59,9 \pm 7,6\%$; kontroll: $100 \pm 12,8\%$; relatív egység átlag \pm SEM; $n=20-23$), míg a PKC-függő foszforilációban nem találtunk különbséget. Szignifikánsan alacsonyabb redukált SH tartalmat, azaz magasabb SH oxidációs szintet találtunk az infarktusos területen. DTT kezelést követően megemelkedett az SH csoportok száma minden csoportban (kontroll: $83,9 \pm 6,2\%$; kontroll+DTT: $100 \pm 3,9\%$; MI Inf: $62,5 \pm 10,3\%$; MI Inf+DTT: $100 \pm 5,4\%$; MI Ant: $49,1 \pm 10,6\%$; MI Ant+DTT: $100 \pm 3,6\%$; $n=8-29$). Az infarktusos szívek mindkét területén szignifikánsan magasabb fokú fehérje-karbonilációt detektáltunk az aktin (kontroll: $100 \pm 3,7\%$; MI Inf: $139,9 \pm 11,8\%$; MI Ant: $145,8 \pm 18,1\%$, $n=10-12$) és az MHC esetében (kontroll: $100 \pm 7,3\%$; MI Inf: $146 \pm 16,9\%$; MI Ant: $206,2 \pm 45,7\%$; $n=11-12$) a kontrollhoz képest, míg az α -aktinin karbonilációs állapotában nem találtunk különbséget. In vitro, mesterségesen előidézett fehérjekarboniláció a szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységét

csökkentette. A szívinfarktus után bekövetkező poszttranszlációs módosulások érintik a kontraktilis rendszer fehérjét. Változás jön létre a TnI foszforilációs státuszában, valamint több fehérje oxidatív károsodást szenved, melyek a posztinfarktusos remodelling meghatározó tényezői lehetnek.

Humán szívelégtelenségben az izolált szívműködő sejtekben magas passzív feszülés mérhető, melynek hátterében a titin molekula megváltozott rugalmassági paraméterei állnak. Jelen tanulmányban a Z-vonalak mellett elhelyezkedő, 100 nm széles titin-aktin átfedést vizsgáltuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy ezen régió oxidatív károsodása milyen mértékben járul hozzá a szívműködő sejtek magas passzív feszüléséhez. Méréseinkhez donorokból származó szívműködő szövetet (Kontroll), valamint aorta stenosisos (AS) és szívelégtelen betegek (HF) biopsziás mintáit használtuk fel. Mechanikai erőmérések során izolált szívműködő sejtek aktív és passzív tulajdonságait határoztuk meg. In vitro dithiotreitol (DTT) kezeléssel vizsgáltuk a myofilamentumok oxidatív károsodásának reverzibilitását. Gelsolin kezeléssel kivontuk a vékony filamentumot, ezzel vizsgálva a titin-aktin interakció hozzájárulását a passzív feszüléshez. Immunfluoreszcens jelöléssel (alpha-aktinin, nitrotyrozín) vizualizáltuk a myofilamentumok oxidatív károsodásának szarkomerikus lokalizációját. Mind a DTT, mind a gelsolin kezelés csökkentette a passzív feszülést a három csoportban. Minél magasabb volt a passzív feszülés a kezeléseket megelőzően, annál nagyobb mértékben csökkent az a kezelésekre való hatás. A Kontroll és az AS csoportban a nitrotyrozilált fehérjék eloszlása a Z-vonalak közé esett. A HF csoportban egész sejtre kiterjedő nitrotyrozín mintázat volt jelen, mely magába foglalta a Z-vonalak területeit is. Konklúzió: a titin-aktin interakció területén létrejövő oxidatív károsodások hozzájárulnak a szívelégtelenségből származó szívműködő sejtek magas passzív feszüléséhez. Ez antioxidáns kezeléssel és/vagy a vékony filamentum eltávolításával csökkenthető. Valószínűsíthető, hogy a Z-vonal fehérjék oxidatív károsodása miatt a titin-aktin interakció passzív feszülésre gyakorolt hatása legkifejezettebben a szívelégtelenségből származó szívműködő sejtekben érvényesül. Ez hozzájárulhat a szívelégtelenség során fellépő kontraktilis diszfunkcióhoz.

Összegezve eredményeinket elmondható, hogy a myofibrilláris fehérjék oxidációja következtében csökken a Ca^{2+} -aktivált erő maximuma és csökkenhet a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenysége, továbbá lassulhat az aktin miozín ciklus sebessége is. Ezen változások hátterében néhány kitüntetett kontraktilis fehérje eltérő mértékű karbonilációja, SH-oxidációja, nitrációja illetve foszforilációja állhat. Mindezen folyamatok hozzájárulhatnak a szív csökkent pumpafunkciójához a fokozott oxidatív stresszel járó kórállapotokban.